

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu II dan Laboratorium Sintesis Kimia Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

4.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian terdiri atas bahan untuk ekstraksi, penapisan fitokimia, dan pengujian secara *in vitro* dengan metode titrimetri.

4.2.1 Bahan Penelitian Untuk Ekstraksi

Bahan yang digunakan dalam ekstraksi dengan metode maserasi adalah sebagai berikut :

- (1) Serbuk simplisia rimpang nampu (*Homalomena occulta*).
- (2) Etanol 96% teknis (Brataco).

4.2.2 Bahan Penelitian Untuk Penapisan Fitokimia

Bahan yang digunakan dalam penapisan fitokimia adalah sebagai berikut:

- (1) Ekstrak etanol rimpang nampu (*Homalomena occulta*).
- (2) Asam klorida (HCl) p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (3) Natrium klorida (NaCl) (SAP Chemicals).
- (4) Toluena p.a (E. Merck).
- (5) Hidrogen peroksida (H₂O₂) p.a (E. Merck).
- (6) Besi (III) klorida (FeCl₃).
- (7) Kalium hidroksida (KOH) (SAP Chemicals).
- (8) Potongan magnesium p.a (E. Merck).
- (9) Butanol p.a (E. Merck).
- (10) Kloroform (CHCl₃) p.a (Fulltime Chemicals).
- (11) Aseton p.a (Mallinckrodt Chemicals).

- (12) Asam formiat p.a (E. Merck).
- (13) Asam asetat anhidrat p.a (E. Merck).
- (14) Asam sulfat (H_2SO_4) p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (15) Ammonia (Brataco).
- (16) Etil asetat p.a (E. Merck).
- (17) Anisaldehyda asam sulfat.
- (18) n-Heksana p.a (E. Merck).
- (19) Etanol 96% teknis (Brataco).
- (20) Air suling (Brataco).

4.2.3 Bahan Penelitian Untuk Pengujian *In Vitro*

Bahan yang digunakan sebagai uji kelarutan kalsium oksalat dengan metode titrimetri adalah sebagai berikut :

- (1) Ekstrak etanol rimpang nampu (*Homalomena occulta*).
- (2) Dinatrium oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) (SAP Chemicals).
- (3) Kalsium klorida dihidrat (CaCl_2) p.a (E. Merck).
- (4) Ammonia (NH_4OH) (Brataco).
- (5) Cystone[®] (Himalaya[®]).
- (6) *Buffer* trisaminometana (Vivantis Technologies).
- (7) Asam sulfat (H_2SO_4) p.a (Mallinckrodt).
- (8) Kalium permanganat p.a (KMnO_4) (E. Merck).
- (9) Asam klorida (HCl) p.a (Mallinckrodt Chemicals).
- (10) pH *buffer* 7,0 (Honmofun[®]).
- (11) Etanol 96% teknis (Brataco).
- (12) Air suling (Brataco).
- (13) Telur.

4.3 Alat Penelitian

4.3.1 Alat Penelitian Untuk Ekstraksi

Alat yang digunakan dalam ekstraksi dengan metode maserasi adalah :

- (1) Seperangkat alat ekstraksi (gelas piala, gelas ukur, bejana maserasi, labu penyaring, *vacuum filtration*, labu alas bulat, pipet tetes, batang pengaduk,

aluminium foil, karet, tisu, *mixer*, kertas saring, corong *buchner*, cawan porselen, sudip, pinset dan penangas air).

- (2) *Rotary evaporator* (Heidolph).
- (3) Timbangan digital (OHAUS SP 202 Scout Pro 200x0,1g).
- (4) Timbangan *analytic balance* (Sartorius ED224).

4.3.2 Alat Penelitian Untuk Penapisan Fitokimia

Alat yang digunakan dalam penapisan fitokimia adalah sebagai berikut :

- (1) Seperangkat alat untuk preparasi sampel (tabung reaksi, gelas ukur, penangas air, pipet tetes, corong gelas, kapas, pinset, penjepit kayu, sudip dan tisu).
- (2) Timbangan digital (OHAUS SP 202 Scout Pro 200x0,1g).
- (3) Timbangan *analytic balance* (Sartorius ED224).
- (4) *Hot plate* (Fisher Scientific).
- (5) Pipa kapiler (Blaubrand®).
- (6) Plat Kromatografi Lapis Tipis (E. Merck).
- (7) Bejana Kromatografi Lapis Tipis (CAMAG).
- (8) Lampu UV 254 dan 365 (Vilber Lourmat).

4.3.3 Alat Penelitian Untuk Pengujian *In Vitro*

Alat yang digunakan sebagai uji kelarutan kalsium oksalat dengan metode titrimetri adalah sebagai berikut :

- (1) Alat-alat untuk membuat sediaan (labu erlenmeyer, gelas piala, labu ukur, cawan porselen, pipet volume, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, pipet *filler*, corong gelas, gelas arloji, sendok porselen, benang kasur, sudip, pinset, tisu, *aluminium foil*, corong *buchner*, kertas saring, mortir dan stamper).
- (2) Timbangan digital (OHAUS SP 202 Scout Pro 200x0,1g).
- (3) Timbangan *analytic balance* (Sartorius ED224).
- (4) *Hot plate* (Fisher Scientific).
- (5) Oven (Binder Oven FD 56).
- (6) Buret (Duran).
- (7) Termometer.
- (8) *pH universal indicator* (E. Merck).
- (9) Statif dan klem.

4.4 Rancang Penelitian

4.4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak etanol rimpang nampu (*Homalomena occulta*) terhadap kelarutan kalsium oksalat pada batu ginjal dengan metode titrimetri.

4.4.2 Variabel Penelitian

4.4.2.1 Variabel Bebas

Sebagai variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi Cystone® yang terdiri dari 5 macam konsentrasi yaitu 8,92 mg; 17,84 mg; 26,76 mg; 35,68 mg; dan 44,60 mg serta konsentrasi ekstrak etanol rimpang nampu yang terdiri dari 5 macam konsentrasi yaitu 10,00 mg; 20,00 mg; 30,00 mg; 40,00 mg dan 50,00 mg.

4.4.2.2 Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung pada penelitian ini adalah persentase kelarutan kalsium oksalat pada 5 macam konsentrasi Cystone® yaitu 8,92 mg; 17,8 4mg; 26,76 mg; 35,68 mg; dan 44,60 mg serta konsentrasi ekstrak etanol rimpang nampu yaitu 10,00 mg; 20,00 mg; 30,00 mg; 40,00 mg dan 50,00 mg.dan ekstrak etanol rimpang nampu.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Determinasi Tanaman

Pemeriksaan atau determinasi tanaman dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi – LIPI.

4.5.2 Ekstraksi Rimpang Nampu

4.5.2.1 Persiapan Serbuk Simplisia

Rimpang nampu dibersihkan dari kulit, dicuci dengan air bersih, dipotong kecil-kecil, kemudian dikeringkan secara tidak langsung di bawah sinar matahari. Rimpang yang telah kering kemudian digiling hingga mencapai derajat halus tertentu sehingga didapatkan serbuk simplisia rimpang nampu.

4.5.2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Nampu

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi berulang dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Langkah-langkah ekstraksi dengan maserasi adalah sebagai berikut (BPOM RI, 2010) :

- (1) Serbuk simplisia rimpang nampu ditimbang lalu dimasukkan ke bejana.
- (2) Etanol 96% diukur dengan gelas ukur lalu dimasukkan ke bejana.
- (3) Campuran serbuk rimpang nampu dan etanol diaduk hingga serbuk terbasahi. Bejana ditutup dan disimpan di tempat kering pada suhu kamar selama 24 jam.
- (4) Hasil maserasi disaring dengan menggunakan corong *buchner* setelah 24 jam sehingga didapatkan filtrat yang jernih. Filtrat disimpan di gelas piala tertutup. Residu hasil dari maserasi pertama dimasukkan ke bejana kembali untuk dimaserasi ulang.
- (5) Etanol 96% diukur dengan gelas ukur lalu dimasukkan ke bejana. Campuran residu dan etanol diaduk sampai semua serbuk terbasahi. Bejana ditutup rapat dan disimpan di tempat kering pada suhu kamar selama 24 jam.
- (6) Hasil maserasi berulang disaring dengan menggunakan corong *buchner* setelah 24 jam sehingga didapatkan filtrat yang jernih. Filtrat dicampur dengan filtrat pertama. Residu hasil dari maserasi berulang pertama dimasukkan ke bejana kembali untuk dimaserasi.
- (7) Etanol 96% diukur dengan gelas ukur lalu dimasukkan ke bejana. Campuran residu dan etanol diaduk sampai semua serbuk terbasahi. Bejana ditutup rapat dan disimpan di tempat kering pada suhu kamar selama 24 jam.
- (8) Hasil maserasi berulang kedua disaring dengan menggunakan corong *buchner* setelah 24 jam sehingga didapatkan filtrat yang jernih. Filtrat dicampur dengan filtrat pertama.
- (9) Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 30° C sampai diperoleh ekstrak yang pekat.
- (10) Ekstrak pekat kemudian diuapkan kembali agar diperoleh ekstrak yang lebih pekat.
- (11) Ekstrak yang telah pekat kemudian disimpan dalam oven pada suhu 30° C dan dihitung % rendemennya.

4.5.3 Penapisan Fitokimia

4.5.3.1 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoida

(1) Persiapan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoida

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan identifikasi senyawa golongan flavonoida dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

A. Preparasi Larutan Blanko

- 1) 0,1 gram ekstrak ditambahkan 3 mL n-heksana kemudian dikocok dan dilakukan berkali-kali dalam tabung reaksi hingga ekstrak tidak berwarna.
- 2) Residu yang didapat dilarutkan dalam 10 mL etanol. Larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko.

B. Preparasi Larutan Sampel

- 1) 0,3 gram ekstrak ditambahkan 3 mL n-heksana kemudian dikocok dan dilakukan berkali-kali dalam tabung reaksi hingga ekstrak tidak berwarna.
- 2) Residu yang didapat dilarutkan dalam 15 mL etanol. Larutan tersebut kemudian dibagi menjadi 3 bagian untuk digunakan pada uji bate-smith metcalf, uji wilstater dan kromatografi lapis tipis.

(2) Reaksi Warna

A. Uji Bate-Smith Metcalf

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan pengujian melalui uji bate-smith metcalf dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi ditambah 0,5 mL HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati perubahan warna yang terjadi.
- 2) Bila menjadi warna merah terang atau ungu maka pada ekstrak mengandung adanya senyawa leukoantosianin.

B. Uji Wilstater

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan pengujian melalui uji Wilstater dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi ditambah 0,5 mL HCl pekat dan 4 potongan magnesium.

- 2) Diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian ditambah 2 mL air suling, dan ditambah 1 mL butanol.
- 3) Diamati warna yang terjadi. Perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat adanya flavonol, merah tua adanya flavonon.

(3) Kromatografi Lapis Tipis

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan uji kromatografi lapis tipis dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil 1 larutan yang telah dibagi kemudian ditotolkan pada fase diam.
- 2) Uji kromatografi lapis tipis menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel 254
 - Fase gerak : Kloroform:aseton:asam formiat (6:6:1)
 - Penampak noda : - pereaksi sitrat borat atau
 - uap ammonia atau
 - asam sulfat 10%
- 3) Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

4.5.3.2 Identifikasi Senyawa Golongan Glikosida Saponin, Triterpenoid dan Steroid

(1) Uji Buih

Sampel yang digunakan dalam uji buih adalah ekstrak etanol rimpang nampu dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

A. Preparasi Larutan Blanko

Ditimbang ekstrak 0,2 gram dimasukkan tabung reaksi, larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko.

B. Uji Buih

Ditimbang ekstrak 0,2 gram dimasukkan tabung reaksi, kemudian ditambah air suling 10 mL, kocok kuat-kuat kira-kira selama 30 detik. Tes buih positif apabila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

(2) Reaksi Warna

A. Preparasi Sampel

1) Preparasi Larutan Blanko

0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam 5 mL etanol. Larutan tersebut digunakan sebagai larutan blanko.

2) Preparasi Larutan Sampel

0,4 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol. Kemudian dibagi menjadi dua bagian masing-masing bagian 5 mL untuk digunakan pada uji lieberman-burchard dan uji salkowski.

B. Uji Lieberman-Burchard

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi kemudian dilakukan uji Liberman-burchard dengan langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil satu larutan yang telah dibagi ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat, diamati adanya perubahan warna.
- 2) Warna hijau biru adanya saponin steroid, merah ungu adanya saponin triterpenoid, warna kuning muda adanya saponin triterpenoid/saponin steroid jenuh.

C. Uji Salkowski

Larutan sampel ekstrak etanol rimpang nampu yang telah dipreparasi dilakukan uji salkowski dengan langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Diambil satu larutan yang telah dibagi ditambah 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi.
- 2) Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbul cincin berwarna merah.

(3) Kromatografi Lapis Tipis

a. Identifikasi Sapogenin Steroid/Triterpenoid

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan uji kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi adanya kandungan sapogenin steroid atau triterpenoid dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987):

- 1) 0,5 gram ekstrak ditambah 5 mL asam klorida 2N, didihkan dan ditutup dengan corong berisi kapas basah selama 50 menit untuk menghidrolisis saponin.

- 2) Setelah dingin, tambah ammonia hingga basa, kemudian ekstraksi dengan 4-5 mL n-heksana sebanyak 2x, uapkan ad 0,5 mL, totolkan pada plat KLT.

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehid asam sulfat (dengan pemanasan)

Adanya sapogenin ditunjukkan dengan warna merah ungu (ungu) untuk anisaldehyd asam sulfat.

b. Identifikasi Terpenoid Atau Steroid Bebas Secara KLT

Sampel ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan uji kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi adanya kandungan terpenoid/steroid dengan langkah-langkah sebagai berikut (Harbone, 1987) :

- 1) Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes n-heksan, aduk hingga larut, totolkan pada fase diam.
- 2) Uji kromatografi lapis tipis menggunakan:

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehyd asam sulfat (dengan pemanasan)
- 3) Adanya terpenoid atau steroid ditunjukkan dengan warna merah ungu atau ungu.

4.5.4 Uji Aktivitas Kelarutan Kalsium Oksalat Secara *In Vitro*

Untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol rimpang nampu dalam melarutkan kalsium oksalat pada batu ginjal maka dilakukan pengujian secara *in vitro* dengan metode titrasi permanganometri.

4.5.4.1 Preparasi Membran Semi-permeabel dari Telur

Membran semi-permeabel telur terletak di antara kulit bagian luar dengan isi bagian dalam seperti albumin dan kuning telur (Jha, 2016). Membran semi-permeabel dipreparasi dengan cara:

- (1) Pucuk telur dilubangi menggunakan batang kaca untuk mengeluarkan seluruh isi telur.

- (2) Telur yang sudah kosong dicuci bersih dengan air suling dan ditempatkan dalam gelas piala yang berisi HCl 2M selama satu malam.
- (3) Setelah membran semi-permeabel terpisah dari cangkangnya, membran selanjutnya dicuci dengan air suling dan direndam dalam larutan amonia untuk menetralisasi sisa asam.
- (4) Setelah direndam dengan ammonia dalam kondisi basah dibilas dengan air suling.
- (5) Membran semi-permeabel disimpan dalam kulkas pada pH 7- 7,4.

4.5.4.2 Pembuatan Kristal Kalsium Oksalat

Pada penelitian ini menggunakan kalsium oksalat yang bertindak sebagai kontrol. Kalsium oksalat dibuat melalui reaksi pengendapan dengan mereaksikan antara $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ dengan CaCl_2 dengan langkah sebagai berikut (Jha, 2016) :

- (1) Ditimbang 1,34 gram $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ dilarutkan dalam 100 mL H_2SO_4 2N.
- (2) Ditimbang 1,47 gram CaCl_2 dilarutkan dalam 100 mL air suling.
- (3) Dicampur keduanya dalam gelas piala yang sama untuk mengendapkan kalsium oksalat.
- (4) Setelah terbentuk endapan, maka endapan dibebaskan dari H_2SO_4 dengan larutan ammonia.
- (5) Endapan kemudian disaring dan dicuci dengan air suling
- (6) Endapan dikeringkan pada suhu 60°C selama 4 jam.

4.5.4.3 Pembuatan Larutan Kalsium Oksalat

Larutan kalsium oksalat dibuat dengan konsentrasi 1 mg/mL dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- (1) Ditimbang kurang lebih 0,1000 gram kalsium oksalat yang sebelumnya telah dibuat melalui reaksi pengendapan.
- (2) Dimasukkan kalsium oksalat ke dalam labu ukur 100,0 mL.
- (3) Kalsium oksalat dilarutkan dengan air suling hingga volume 100,0 mL, dikocok hingga larut dan homogen.

4.5.4.4 Pembuatan Larutan *Buffer* Trisaminometana

Buffer trisaminometana dibuat dengan konsentrasi 0,1 M sebanyak 1000,0 mL dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- (1) Ditimbang *buffer* trisaminometana sebanyak 12,114 gram.
- (2) *Buffer* trisaminometana dimasukkan ke labu ukur.
- (3) Ditambahkan ke dalam labu ukur air suling hingga volume 1000,0 mL, dikocok hingga homogen.

4.5.4.5 Pembuatan Larutan KMnO_4

Pada penelitian kali ini dilakukan titrasi dengan menggunakan kalium permanganat (KMnO_4) sebagai titran. Larutan KMnO_4 dibuat dengan konsentrasi 0,02 N sebanyak 200,0 mL dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- (1) Ditimbang kurang lebih 0,1280 gram hablur KMnO_4 .
- (2) Dimasukkan hablur KMnO_4 ke dalam labu ukur 200,0 mL.
- (3) Hablur KMnO_4 dilarutkan dengan air suling hingga volume 200,0 mL, dikocok sampai homogen.

Larutan disimpan selama 1 minggu kemudian disaring dengan kaca masir. (untuk proses lebih cepat, didihkan terlebih dahulu 25 menit dan disaring setelah larutan dingin).

4.5.4.6 Persiapan Standarisasi Larutan KMnO_4

Penetapan normalitas larutan atau standarisasi larutan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi larutan KMnO_4 secara tepat menggunakan standar primer dinatrium oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- (1) Dipipet larutan $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,0201 N sebanyak 10 mL lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer.
- (2) Ditambahkan ke dalam labu erlenmeyer 20 mL H_2SO_4 2 N kemudian dipanaskan hingga suhu 70°C .
- (3) Dalam keadaan panas larutan dititrasi dengan KMnO_4 0,02 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda.
- (4) Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

4.5.4.7 Persiapan Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah kalsium oksalat yang sebelumnya telah dibuat melalui reaksi pengendapan. Kontrol negatif dibuat dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- (1) Dipipet larutan kalsium oksalat sebanyak 1,0 mL kemudian dimasukkan ke dalam membran semi-permeabel.
- (2) Membran yang berisi kalsium oksalat kemudian direndam dengan 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer.
- (3) Labu erlenmeyer yang mengandung membran semi-permeabel disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.

4.5.4.8 Persiapan Pembuatan Kontrol Positif

Pada penelitian ini menggunakan Cystone[®] sebagai kontrol positif dengan berbagai konsentrasi dimana tiap tablet Cystone[®] mengandung bahan aktif sebanyak 223 mg. Larutan baku induk Cystone[®] dibuat dengan cara menimbang 2 tablet Cystone[®], tablet kemudian digerus hingga halus dan dipisahkan dari bagian penyalutnya. Selanjutnya dilarutkan dengan etanol 96% hingga 50,0 mL pada labu ukur dan dikocok hingga homogen. Larutan Cystone[®] kemudian disaring hingga didapatkan larutan yang jernih sehingga didapat konsentrasi 8,92 mg/mL sebagai LBI. Konsentrasi Cystone[®] yang digunakan yaitu 8,92 mg; 17,84 mg; 26,76 mg; 35,68 mg dan 44,60 mg, dimana pada kontrol positif ini dilakukan pengujian sebanyak tiga kali replikasi.

Kontrol positif dibuat dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- KP 1 :Dibuat konsentrasi 8,92 mg dengan dipipet 1,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KP 2 :Dibuat konsentrasi 17,84 mg dengan dipipet 2,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer*

trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.

- KP 3 :Dibuat konsentrasi 26,76 mg dengan dipipet 3,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KP 4 :Dibuat konsentrasi 35,68 mg dengan dipipet 4,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KP 5 :Dibuat konsentrasi 44,6 mg dengan dipipet 5,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.

4.5.4.9 Persiapan Pembuatan Kelompok Uji

Pembuatan larutan baku induk ekstrak etanol rimpang nampu dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 0,5000 gram kemudian dilarutkan dalam etanol 96% hingga volume 50,0 mL dalam labu ukur dan dikocok hingga larut sehingga didapat konsentrasi 10 mg/mL sebagai LBI. Ekstrak etanol rimpang nampu diuji dalam beberapa seri konsentrasi yaitu 10,00 mg; 20,00 mg; 30,00 mg; 40,00 mg dan 50,00 mg, dimana pada kelompok uji ini dilakukan pengujian sebanyak tiga kali replikasi.

Kelompok uji dibuat dengan langkah-langkah sebagai berikut:

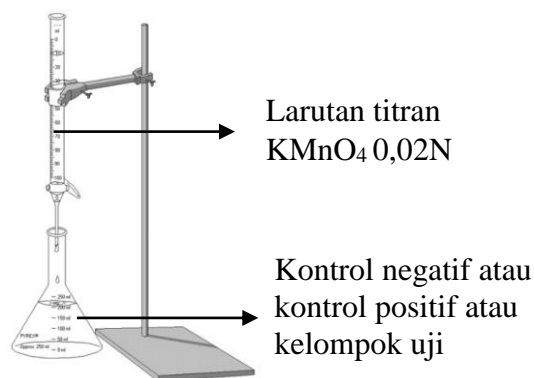
- KU 1 :Dibuat konsentrasi 10,00 mg dengan dipipet 1,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.

- KU 2 :Dibuat konsentrasi 20,00 mg dengan dipipet 2,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KU 3 :Dibuat konsentrasi 30,00 mg dengan dipipet 3,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KU 4 :Dibuat konsentrasi 40,00 mg dengan dipipet 4,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.
- KU 5 :Dibuat konsentrasi 50,00 mg dengan dipipet 5,0 mL LBI yang dikemas bersama dengan 1,0 mL kalsium oksalat ke dalam membran semi-permeabel. Membran kemudian direndam dalam 100 mL *buffer* trisaminometana 0,1M didalam labu erlenmeyer dan disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 jam.

4.5.4.10 Prosedur Titrasi Kalsium Oksalat dengan Permanganometri

Setelah kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok uji selesai diinkubasi, maka selanjutnya dilakukan titrasi dengan menggunakan larutan KMnO_4 dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- (1) Dipindahkan sisa isi membran semi-permeabel ke dalam erlenmeyer terpisah.
- (2) Ditambahkan 2,0 mL larutan H_2SO_4 2N ke dalam erlenmeyer.
- (3) Larutan dipanaskan diatas *hot plate* hingga mencapai suhu 70°C.
- (4) Setelah tercapai suhu 70°C larutan dititrasi dengan 0,02 N KMnO_4 hingga diperoleh titik akhir warna merah muda.
- (5) Diamati volume titran KMnO_4 yang terbaca pada buret setelah tercapainya titik akhir titrasi berwarna merah muda.



Gambar 4.1 Ilustrasi Metode Titrimetri

4.6 Analisis Data

4.6.1 Analisis Kalsium Oksalat Terlarut

Data yang diperoleh setelah dilakukannya prosedur titrasi adalah volume titran KMnO_4 yang terbaca hingga diperolehnya titik akhir titrasi berupa warna merah muda. Volume tersebut kemudian dikonversi dimana setiap mililiter KMnO_4 0,9494N setara dengan 0,1898 mg kalsium oksalat (Jha, 2016). Kalsium oksalat yang didapat dari hasil konversi tersebut merupakan kalsium oksalat yang tidak terlarut, sehingga untuk menentukan bobot kalsium oksalat terlarut dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Bobot CaC}_2\text{O}_4 \text{ terlarut} = \text{bobot CaC}_2\text{O}_4 \text{ awal} - \text{bobot CaC}_2\text{O}_4 \text{ tidak terlarut}$$

4.6.2 Analisis Perhitungan Persentase Kelarutan Kalsium Oksalat

Persentase kelarutan kalsium oksalat diperoleh dari berat kalsium oksalat terlarut yang kemudian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Persentase kelarutan kalsium oksalat} = \frac{\text{Berat kalsium oksalat terlarut}}{\text{Berat kalsium oksalat awal}} \times 100\%$$

Setelah diketahui persentase kelarutan kalsim oksalat, maka dihitung persentase rata-rata dari masing-masing konsentrasi. Lalu dari hasil rata-rata tersebut dibuat diagram untuk mengetahui linearitas dari peningkatan konsentrasi kelompok uji dengan jumlah kalsium oksalat terlarut yang dibandingkan dengan Cystone®.

4.6.3 Analisis Uji Statistika

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa persentase kalsium oksalat terlarut. Data tersebut kemudian dianalisis menggunakan uji *One Way* ANOVA, uji homogenitas dan uji *Post-Hoc* LSD yang pengolahannya menggunakan aplikasi SPSS 18.0.

- a. Uji *One Way* ANOVA merupakan uji hipotesis untuk *variabel numeric* lebih dari dua kelompok. Hasil uji *One Way* ANOVA dikatakan ada pengaruh yang bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$. Sebelum dilakukan uji *One Way* ANOVA perlu dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui kehomogenan varian dari data-data yang diperoleh (data bersifat homogen jika $p > 0,05$).
- b. Uji *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar kelompok uji.
- c. Uji Anova dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh ekstrak etanol rimpang nampu (*Homalomena occulta*) terhadap kelarutan kalsium oksalat.

